



19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**  
10 **DE 197 31 609 A 1**

51 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 N 15/11**  
C 12 N 15/54  
C 07 H 21/00  
C 12 Q 1/68  
A 61 K 48/00

21 Aktenzeichen: 197 31 609.3  
22 Anmeldetag: 23. 7. 97  
43 Offenlegungstag: 18. 2. 99

DE 197 31 609 A 1

71 Anmelder:  
Boehringer Ingelheim Pharma KG, 55218  
Ingelheim, DE

72 Erfinder:  
Budzinski, Ralph, Dr., 88400 Biberach, DE; Krist,  
Bernd, Dr., 89075 Ulm, DE; Mark, Michael, Dr.,  
88400 Biberach, DE; Müller, Peter, Dr., Stamford,  
Conn., US

56 Entgegenhaltungen:  
Nature Vol.327, S.632-634, 1987;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Cholesterylester-Transferprotein (CETP)-mRNA als Zielmolekül in der Therapie von Atherosklerose

57 Die vorliegende Erfindung betrifft CETP-mRNA als Zielmolekül für die Behandlung von Atherosklerose durch Suppression der CETP-Genexpression. Insbesondere betrifft die Erfindung CETP-Translationsinhibitoren sowie Verfahren zum Auffinden von CETP-Translationsinhibitoren. Insbesondere betrifft die Erfindung synthetische Oligonukleotide mit Sequenzen, die wenigstens teilweise komplementär zur humanen CETP-mRNA sind, und deren Verwendung in der Therapie von Gefäßerkrankungen.

DE 197 31 609 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft CETP-mRNA als Zielmolekül für die Behandlung Atherosklerose durch Suppression der CETP-Genexpression. Insbesondere betrifft die Erfindung CETP-Translationsinhibitoren sowie Verfahren zum Auffinden von CETP-Translationsinhibitoren. Insbesondere betrifft die Erfindung synthetische Oligonukleotide mit Sequenzen, die wenigsten teilweise komplementär zur humanen CETP-mRNA sind, und deren Verwendung in der Therapie von Gefäßerkrankungen.

Cholesterylester-Transferprotein (CETP) katalysiert den Transfer und Austausch von Cholesterylester und Triglyzeriden zwischen Lipoproteinen hoher Dichte (High Density Lipoproteins, HDL) aus dem Serum und Triglyzerid enthaltenden Lipoproteinen sehr niedriger Dichte (Very Low Density Lipoproteins, VLDL) sowie Lipoproteinen niedriger Dichte (Low Density Lipoproteins, LDL). In normolipämischen Individuen fördert dieser Austausch den reversen Cholesterintransport aus der Peripherie zu katabolischen Orten in der Leber. In hyperlipämischen Patienten jedoch, bei denen der Abbau von VLDL und LDL verschlechtert ist, erhöht er die Menge an Cholesterylester in LDL und verstärkt dessen atherogenes Potential. Deshalb wird die Modulation der CETP-Aktivität entweder durch direkte Inhibition oder durch Herunterregulierung der CETP-Expression als möglicher therapeutischer Interventionspunkt betrachtet (Kushwaha et al, J. of Lipid Research, 34, 1285-1297, 1993). Dies wird durch den Befund gestützt, daß CETP-Defizienz, die in einigen japanischen Familien gefunden wurde, zu hohen HDL-Spiegeln führt (Koizumi et al., Atherosclerosis, 58, 175-186, 1985). Inhibition von CETP führt zu einer HDL-Cholesterin-Erhöhung und einer parallelen  $\beta$ -Uoprotein-Cholesterin-Erniedrigung, wie durch die Verabreichung eines CETP-Antikörpers bei Hamstern gezeigt werden kann. In transgenen Mäusen, die hohe CETP-Spiegel exprimieren, sind die HDL-Spiegel deutlich reduziert, und es entwickeln sich atherosklerotische Lesionen (Nature, 364, 73, 1993).

CETP als ein Protein mit einer allgemeinen Affinität für lipophile Liganden ist ein bemerkenswert schlechtes Zielmolekül für pharmakologische Zwecke. Bis heute sind die einzigen behaupteten Inhibitoren entweder peptidähnlich (WO 9504755, Kanda et al.; WO 9605227, Buttner et al.) oder Liganden mit niedriger Affinität (WO 9506626, WO 950309, JP 09059155-A). Diese Beschränkungen könnten überwunden werden, wenn das Zielmolekül auf anderen Ebenen der biologischen Hierarchie angesprochen wird, im allgemeinen Signalübertragung (G.R. Crabtree, Science, 262, 1019-1024, 1993) mit anschließender Transkription des CETP-Gens (M.D. Lane, Annu. Rev. Biochem., 64, 347-373, 1995; V.R. Baichwal, Tibtech, 11, 11-18, 1993), als auch die Translation der mRNA in das Präprotein (WO 9629279; L. Couture et al.) und seine Prozessierung in das reife Protein. Wenn solche Strategien verfolgt werden, könnte ein Zielmolekül wie CETP direkt auf Ebene seines Gens oder seiner mRNA angesprochen werden.

Ein bekannter Ansatz für solche Nukleinsäure-Zielmoleküle ist die sogenannte nukleinsäure-bindende (antisense) Oligonukleotid-Technologie (siehe z. B. Agrawal, Trends in Biotech. 10, 152, 1992). Durch Bindung an die komplementäre Nukleinsäuresequenz innerhalb einer gegebenen mRNA sind nukleinsäure-bindende Oligonukleotide in der Lage, die Translation in das korrespondierende Protein zu inhibieren. Für diesen Zweck muß die Sequenz wenigsten teilweise komplementär zum Zielmolekül sein. Statistische Auswertungen, die auf der Größe des Genomes beruhen, legen einer Sequenzlänge von 17 Basen für eine selektive Erkennung nahe.

In den meisten Fällen jedoch sind nicht modifizierte nukleinsäure-bindende Oligonukleotide für die Verwendung in in-vivo-Systemen wegen ihrer Anfälligkeit gegenüber nukleolytischem Abbau ungeeignet. Deshalb wurden große Anstrengungen unternommen, Oligonukleotide zu modifizieren, um sie widerstandsfähig gegen solche Angriffe zu machen, wobei die Moleküle für Verwendung in vivo stabilisiert wurden. Ein Schwerpunkt lag dabei in der Modifikation der internukleotidischen Phosphatreste (Phosphorothioate: Raparort et al. [1992] Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 8577-8580), den Nukleosideinheiten (2'-O-Alkyl: M.L. Birnstiel et al. [1991] Nucl. Acids Res. 19, 10, 2629-2635), Bindungsinversionen (Selig et al. [1991] Nucleosides & Nucleotides, 10, 469477), oder Einführung anderer Elemente anstelle der Internukleotidphosphate (PNA: J.C. Hanvey et al. [1992] Science, 258, 1481-1485). Solche modifizierten nukleinsäure-bindenden Oligonukleotide sind in der Lage, dem nukleolytischen Abbau zu widerstehen, und können trotzdem Hybride mit Zielsequenzen bilden, um die entsprechende biologische Funktion zu modulieren.

Zusätzlich zum Bindungsmechanismus können nukleinsäure-bindende Oligonukleotide durch anschließenden Abbau des Zielmoleküls in ihrer Potenz verstärkt werden. Sequenzen, die eine DNA/RNA ähnliche Heterohelix erzeugen, können RNase H zur mRNA führen und so eine enzymatische Spaltung der mRNA bewirken. Das nukleinsäure-bindende Oligonukleotid selbst kann auch ein Spaltungsagens sein, wenn eine katalytische Hammerkopf(hammerhead)-Domäne oder ein synthetischer RNA-Transesterifizierungskatalysator in die Sequenz integriert wird.

Solch ein Ansatz ist Gegenstand der Patentanmeldung WO 9620279, worin endogen freigesetzte Ribozyme als Werkzeuge für CETP-mRNA Spaltung beschrieben werden, zur Vorbeugung oder Behandlung der frühen Entwicklung, des Fortschritts oder der Regression vaskulärer Erkrankungen, insbesondere familiärer Hypercholesterinämie.

Die Entdeckung der zweifachen Funktionalität von RNA als einem Träger von Informationen über ihre Sequenz als auch funktioneller Tertiärstrukturen (The RNA World: CSHL Press, 1993, R.R. Gesteland, J.F. Atkins Hrsg.) als allgemeines Prinzip führte zu einem überlegenen Konzept, RNA gezielt anzusprechen. Solche Strukturen können für die Entwicklung von Wirkstoffen analog zu den Techniken verwendet werden, wie sie für proteinische Zielmoleküle verwendet werden.

Nukleinsäure-bindende Oligonukleotide sind abhängig von der Erkennung der Primärstruktur des Zielmoleküls durch Basenpaarung. Die normalerweise erforderliche Größe eines Oligomers bestehend aus 15-20 Monomeren führt zu einem Molekulargewicht von 4000 g/mol. Trotz dieser Größe kann die Selektivität auf Grund der Erkennung von schwächeren Bindungsstellen, gekennzeichnet durch die Akzeptanz verschiedener Fehlpaarungen, immer noch gering sein. Die Nutzbarmachung tertiärer Wechselwirkungen, wie für nukleinsäure-bindende Oligonukleotide für Introns der Gruppe I gezeigt wurde, kann jedoch die Bindungsaktivität und Selektivität um den Faktor 65000 steigern (Biochemistry 32, 19, 5247-5256, 1993).

In Analogie zu solchen verbesserten nukleinsäure-bindenden Oligonukleotiden können auch nicht-nukleotidische Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 2000 g/mol auf Grund exklusiver Erkennung einer komplexen tertiären

Struktur in Betracht gezogen werden (C.T. Lauhon et al., J. Am. Chem. Soc., 117, 1246-1257, 1995).

Gegenwärtige Ansätze für die Inhibition der CETP-Aktivität basieren auf peptidischen Komponenten, die in für therapeutische Spiegel relevanten Mengen schwierig zu verabreichen sind, und auf Verbindungen mit niedrigem Molekulargewicht, aber nur schlechter Aktivität und Selektivität.

CETP-mRNA als neues Zielmolekül für die Modulation des reversen Cholesterintransports: Primärstrukturen für das CETP-Gen wurden von Agellon et al. (Biochemistry, 29, 1372-1376, 1990) und Drayna et al. (Nature, 327, 632, 1987) beschrieben und basieren auf Daten, die aus genomischer DNA erhalten wurden. Wir beschreiben hier eine neue Sequenz, die auf einer in vivo erzeugten CETP-mRNA-Spezies beruht, von einem neuen Transkriptionsstartpunkt abgeleitet ist und sich in der Länge der 5'-nicht-kodierenden Region (5'-UTR) unterscheidet. Sie startet bei der genomischen Position -30 und hat eine Länge von 1687 Monomeren (Sequenz ID NO.: 14). Diese Spezies repräsentiert mehr als 80% der CETP-mRNA und ist deshalb die biologisch relevante Sequenz.

Die vorliegende Erfindung betrifft Cholesterylester-Transferprotein(CETP)-mRNA als Zielmolekül für die Behandlung von Atherosklerose durch Suppression der CETP-Genexpression. In einem Aspekt betrifft die Erfindung CETP-Translationsinhibitoren, deren Verwendung in der Therapie von Erkrankungen, bei denen CETP eine Rolle spielt, sowie Verfahren zum Auffinden von CETP-Translationsinhibitoren. Insbesondere betrifft die Erfindung synthetische Oligonukleotide mit Sequenzen, die wenigstens teilweise komplementär zur humanen CETP-mRNA sind, und deren Verwendung in der Therapie von Gefäßerkrankungen.

Ein Aspekt der Erfindung ist ein Transkript des menschlichen Cholesterylester-Transferprotein(CETP)-Gens, das eine 5'-nichttranslatierte Region mit einer regulatorischen Sequenz enthält. Bevorzugt hat diese regulatorische Sequenz eine Haarnadelstruktur (hairpin). Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Transkript, das eine 5'-nichttranslatierte Region von mindestens 30 Nukleotiden enthält. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes Transkript in seiner 5'-nichttranslatierten Region die Nukleotidsequenz GGGCCACUU. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes Transkript in seiner 5'-nichttranslatierten Region die Nukleotidsequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält ein erfindungsgemäßes Transkript in seiner 5'-nichttranslatierten Region die Nukleotidsequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCU. Ebenfalls bevorzugt ist eine Ausführungsform, in der das Transkript mindestens 80% der menschlichen CETP-mRNA repräsentiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes Transkript dadurch gekennzeichnet, daß es eine Sequenz hat oder enthält, die ein Transkript der Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 14 oder einer allelen Variante dieser Sequenz darstellt. In einer weiteren Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes Transkript gegenüber der natürlich vorkommenden mRNA am 3'-Ende um ein oder mehrere Nukleotide verkürzt. Das Transkript kann eine CAP-Struktur aufweisen. Das erfindungsgemäße Transkript kann zusätzlich ein transkribiertes Reportergen oder Teile davon enthalten, beispielsweise das Luciferasegen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein rekombinantes DNA-Molekül, das für eines der erfindungsgemäßen Transkripte kodiert. Bevorzugt hat oder enthält ein erfindungsgemäßes DNA Molekül die Sequenz SEQ ID NO: 14 oder einen Teil dieser Sequenz, mindestens aber die Nukleotidsequenz GGGCCACTT. In einer weiteren Ausführungsform enthält es mindestens die Sequenz GGGCCACTTA CACACCCTG CCTGATAACC. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die genannten Sequenzen mit einem Reportergen oder Teilen davon verknüpft, beispielsweise mit dem Luciferasegen. In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei diesem DNA-Molekül um einen Vektor, insbesondere um einen Expressionsvektor. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül ein Plasmid. In einer anderen Ausführungsform ist das erfindungsgemäße DNA-Molekül ein viraler Vektor. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Wirtszelle, in die ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül eingeführt wurde. Dies kann eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle sein. Insbesondere kann es eine bakterielle Wirtszelle oder eine Säugerzelle sein. Besonders bevorzugt als Wirtszellen sind E. coli, HepG2-, CHO-, COS- oder BHK-Zellen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Ribonukleinsäure, entsprechend einer DNA, die die Sequenz SEQ ID NO: 14 oder einer allelen Variante dieser Sequenz oder einem Teil dieser Sequenzen hat oder enthält, wobei diese Ribonukleinsäure mindestens die Sequenz GGGCCACUU enthält. Bevorzugt enthält eine erfindungsgemäße Ribonukleinsäure mindestens die Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Ribonukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens einen Teil der translatierten Region des menschlichen CETP-Gens enthält. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Ribonukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens 90% der menschlichen CETP-mRNA repräsentiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Ribonukleinsäure dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Transkript einer DNA darstellt, die die Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 14 hat oder enthält. Die erfindungsgemäße Ribonukleinsäure kann eine CAP-Struktur haben. Die erfindungsgemäße Ribonukleinsäure kann zusätzlich ein transkribiertes Reportergen oder Teile davon enthalten, beispielsweise das Luciferasegen.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Transkriptes oder einer erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure zum Auffinden von Substanzen, die die CETP-Expression inhibieren können, insbesondere die Translation eines CETP-Transkriptes.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die CETP-Expression inhibieren können, bei dem gemessen wird, ob eine Testsubstanz an die 5'-nichttranslatierte Region eines erfindungsgemäßen Transkriptes oder einer erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure binden kann. Eine bevorzugte Ausführungsform eines solchen Verfahrens besteht darin, daß die Bindung einer Testsubstanz an die 5'-nichttranslatierte Region des CETP-Gens mit einem Meßverfahren gemessen wird, das auf dem Effekt der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) beruht. In einer bevorzugten Ausführungsform wird dabei die BIAcore™-Technologie angewendet. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein 5'-terminal biotinyliertes RNA-Oligonukleotid, das die 5'-nichttranslatierte Region des CETP-Gens repräsentiert, auf einem kommerziell erhältlichen geeigneten Mikrochip über eine Streptavidin-Biotin-Bindung immobilisiert. Ein geeignetes RNA-Oligonukleotid ist insbesondere in der Lage, die für die 5'-nichttranslatierte Region des CETP-Gens charakteristische Haarnadelstruktur auszubilden. Bevorzugt sind dabei RNA-Oligonukleotide, die die Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC AUGCUG (Position -30 bis 6 der Se-

quenz ID NO.: 14) haben oder enthalten. Weitere bevorzugte Ausführungsformen haben oder enthalten die Sequenzen GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC (Position -30 bis 0 der Sequenz ID NO.: 14) oder GGGCCA-  
CUUA CACACCACUG CCU (Position -30 bis -7 der Sequenz ID NO.: 14). Die Testsubstanz, beispielsweise ein nukleinsäure-bindendes Oligonukleotid, wird dann mit dem immobilisierten RNA-Oligonukleotid in Kontakt gebracht, das  
5 System gegebenenfalls gewaschen, und die Resonanzeinheiten gemessen. Bevorzugt wird das RNA-Oligonukleotid in verschiedenen Meßzellen in unterschiedlichen Konzentrationen immobilisiert.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren, bei dem die Translationsrate eines erfindungsgemäßen Transkripts oder einer erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure in Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen und mit der entsprechenden Translationsrate in Abwesenheit der Testsubstanz verglichen wird. Ein solches Verfahren kann in einem zellfreien (in vitro) oder einem zellbasierten System durchgeführt werden. Eine bevorzugte Ausführungsform eines solchen  
10 Verfahrens besteht in einem zellfreien in-vitro-Translationssystem. Eine Ausführungsform eines solchen in-vitro-Translationssystems enthält als Komponenten mindestens Retikulozytenlysat, Aminosäuren und ein erfindungsgemäßes Transkript oder eine erfindungsgemäße Ribonukleinsäure. Bevorzugt wird mit einem erfindungsgemäßen Verfahren (sowohl in der zellfreien als auch in der zellbasierten Ausführungsform) die Menge des synthetisierten Proteins in An- bzw. Ab-  
15 wesenheit der Testsubstanz gemessen und die erhaltenen Werte miteinander verglichen. Liegt die Menge des pro Zeiteinheit synthetisierten Proteins in Anwesenheit der Testsubstanz niedriger als der Vergleichswert (d. h. Abwesenheit der Testsubstanz), inhibiert die Testsubstanz die Translation in diesem Test. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein erfindungsgemäßes Verfahren im Hochdurchsatz-Musterungs-Format (High throughput screening, HTS) ausgeführt. Dabei wird in einer geeigneten Anordnung eine große Zahl von Testsubstanzen gleichzeitig geprüft. Ein solches HTS-Verfahren kann vorteilhaft voll- oder teilautomatisiert sein und die Auswertung durch elektronische Datenverarbeitung erfolgen. Vorteilhaft wird eine Testsubstanz, die im zellfreien System eine inhibierende Wirkung zeigte, zusätzlich in einem zellbasierten System geprüft.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine Substanz, die die CETP-Expression inhibieren kann, erhältlich mit einem der erfindungsgemäßen Verfahren. Bevorzugt sind Substanzen, die an die 5'-nichttranslatierte Region eines erfindungsgemäßen Transkripts oder einer erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure, insbesondere einer CETP-mRNA, binden können. Eine solche Bindung kann vorzugsweise in einem physiologischen Milieu erfolgen, wie es zum Beispiel im Zytoplasma einer Säugerzelle herrscht, und ist vorzugsweise spezifisch. Besonders bevorzugt sind Substanzen, die durch die Bindung an die 5'-nichttranslatierte Region eines erfindungsgemäßen Transkripts oder einer erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure, insbesondere einer CETP-mRNA, dessen/deren Translation hemmen können. Solche Substanzen sind geeignet, die CETP-Expression zu hemmen. In einer bevorzugten Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Substanz an die Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC binden. In einer weiteren Ausführungsform kann eine erfindungsgemäße Substanz an die Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCU binden. In einer vorteilhaften Ausführungsform ist eine solche Substanz ein nukleinsäurebindendes (antisense) Oligonukleotid. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein solches nukleinsäure-bindendes Oligonukleotid ein DNA- oder RNA-Oligonukleotid, oder ein  
30 nukleotidisches Derivat, das gegen nukleolytischen Abbau stabilisiert ist, z. B. ein Phosphorothioat-Oligonukleotid. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Substanz ein Hammerkopf-Ribozym. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Substanz eine nicht-Nukleotid-Verbindung mit einem Molekulargewicht weniger als 2000 g/mol. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Substanz eine nicht-Nukleotid-Verbindung mit einem Molekulargewicht von mindestens 250 g/mol und weniger als  
40 2000 g/mol.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist eine erfindungsgemäße Substanz zur pharmazeutischen Verwendung. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Substanz zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Gefäßkrankheiten, bei denen CETP eine pathogene Rolle spielt, insbesondere Atherosklerose. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung einer erfindungsgemäßen Substanz zur Herstellung eines Arzneimittels zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Gefäßkrankheiten, bei denen CETP eine pathogene Rolle spielt, insbesondere Atherosklerose.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein nukleinsäure-bindendes (antisense) Oligonukleotid, das an die 5'-nichttranslatierte Region eines erfindungsgemäßen Transkripts oder einer erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure, insbesondere einer CETP-mRNA, binden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform hat ein solches nukleinsäure-bindendes Oligonukleotid die Fähigkeit, mit der 5'-nichttranslatierten Region eines erfindungsgemäßen Transkripts oder einer erfindungsgemäßen Ribonukleinsäure, insbesondere einer CETP-mRNA oder einem Abschnitt davon zu hybridisieren, vorzugsweise in einem physiologischen Milieu. Eine solche Hybridisierung ist vorzugsweise spezifisch für die Zielsequenz. Ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid besteht vorzugsweise aus mindestens 7 und höchstens 50 Nukleotiden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besteht es aus mindestens 15 und höchstens 35 Nukleotiden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform besteht ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid aus mindestens 7 Nukleotiden, vorzugsweise mindestens 10 Nukleotiden, vorzugsweise mindestens 15 Nukleotiden, und hat oder enthält die Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 12 oder einen Teil einer dieser Sequenzen. In einer bevorzugten Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid die Fähigkeit, an die Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC AUGC zu binden. In einer bevorzugten Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid die Fähigkeit, unter physiologischen Bedingungen, wie sie beispielsweise im Zytoplasma einer Säugerzelle herrschen, mit der Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC AUGC oder einem Teil dieser Sequenz zu hybridisieren, insbesondere der Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCU. In einer bevorzugten Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid eine DNA oder eine RNA oder ein effektives Derivat davon. Besonders bevorzugt ist ein solches Derivat gegenüber DNA oder RNA im Hinblick auf nukleolytischen Abbau stabilisiert. Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid dadurch stabilisiert, daß es 3',3'-Didesoxynukleoside, 3',3'-Inversionen, Phosphorothioat- und/oder Methylphosphonat-Derivate enthält.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein erfindungsgemäßes Oligonukleotid zur pharmazeutischen Verwendung. Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Oligonukleotides zur prophylaktischen oder

therapeutischen Behandlung von Gefäßkrankheiten, bei denen CETP eine pathogene Rolle spielt, insbesondere Atherosklerose.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zur Messung der Bindung einer Substanz an eine Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß es auf dem Effekt der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) beruht. Bevorzugt wird dabei die Biomolekulare Interaktionsanalyse (BIA) angewendet. In einer bevorzugten Ausführungsform wird dafür das BIAcore®-System verwendet. Bevorzugt ist eine Substanz, deren Bindung an eine Nukleinsäure in dem erfindungsgemäßen Verfahren geprüft wird, eine nukleotidische Substanz, bevorzugt ein Oligonukleotid, oder eine nicht-Nukleotid-Verbindung mit einem Molekulargewicht von weniger als 2000 g/mol. Bevorzugt hat die nicht-Nukleotid-Verbindung ein Molekulargewicht von mindestens 250 g/mol und weniger als 2000 g/mol. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die geprüfte Substanz eine DNA, eine RNA, ein Phosphorothioat-Oligonukleotid oder Hammerkopf-Ribozym. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Nukleinsäure auf einem kommerziell erhältlichen geeigneten Mikrochip immobilisiert. Die Testsubstanz, deren Bindung an die Nukleinsäure gemessen werden soll, beispielsweise ein nukleinsäure-bindendes Oligonukleotid, wird dann mit der immobilisierten Nukleinsäure in Kontakt gebracht, das System gegebenenfalls gewaschen, und die Resonanzeinheiten gemessen. Bevorzugt wird die Nukleinsäure in verschiedenen Meßzellen in unterschiedlichen Konzentrationen immobilisiert.

Um den Einfluß der 5'-UTR für die Translation zu bestimmen, wurden die relativen Translationsraten mehrerer verkürzter Konstrukte der CETP-mRNA verglichen. Wie in Beispiel 2 beschrieben, ändert sich die Translationseffizienz signifikant mit der Länge des 5'-UTR. Ein kritischer Schritt, der zu einer 50%igen Reduktion der Rate führte, ist die Kürzung der Sequenz um 3 Nukleoside von Position -30 bis Position -27. Dies zeigt klar ein Optimum für die Sequenz an, die in vivo bei Position -30 beginnt. Im Falle kürzerer Längen ist die Translation signifikant verschlechtert. Der Vergleich von mRNAs mit oder ohne Cap ergab, daß CETP-mRNA, die bei Position -30 anfing, in der Lage ist, in vitro die Translation auch durch einen Cap-unabhängigen Mechanismus zu vermitteln.

Wir verwendeten einen Satz nukleinsäure-bindender Oligonukleotide (Sequenz ID Nos.: 1, 2) als Werkzeuge in einem in vitro Translationstest, um die funktionelle Relevanz des 5'-UTR zu überprüfen. Die Sequenzen, die die Region von -30 bis 4 abdeckten, wurden in einer Konzentration von 4 µM verwendet und inhibierten die CETP Translation zwischen 27% und 82%.

Es ist bekannt, daß nukleinsäure-bindende DNA-Oligonukleotide ihren Effekt auf das Zielmolekül über eine durch RNase-H vermittelte Verdauung des gebildeten DNA/RNA-Hybrides ausüben können. Wir schlossen diese Möglichkeit aus, indem wir nukleinsäurebindende RNA-Oligonukleotide (Sequenz ID Nos.: 5, 12) verwendeten, um den Effekt auf Bindungsereignis zu begrenzen. Die Oligonukleotide zeigten nun eine etwas reduzierte Aktivität mit einer IC50 von 1.6 µM, inhibierten jedoch immer noch die Translation relativ zu anderen inaktiven nukleinsäure-bindenden Sequenzen, die gegen die Positionen 225-239 oder 1101-1113 gerichtet waren. Die Modulation der Translationseffizienz durch nukleinsäure-bindende Oligonukleotide bestätigt die kritische Funktion der Region -30 bis 0 für die Translation.

Die folgenden funktionellen Ergebnisse:

- a) der "Zusammenbruch" der Translation nach Entfernung der 3 kritischen Nukleoside
- b) die Existenz einer Cap-unabhängigen Translationsverstärkung
- c) die Sensitivität des 5'-Endes gegenüber nukleinsäure-bindenden Oligonukleotiden

legen die Existenz eines cis-agierenden Elementes in der 5'-UTR der CETP-mRNA nahe, das einen Verstärker (enhancer) der Cap-abhängigen und -unabhängigen Translation darstellt.

Der Vergleich mit anderen Beispielen von Cap-unabhängigen Translationsmechanismen legt die Existenz einer RNA-Struktur nahe, die in diesem regulatorischen Element involviert ist.

Eine Berechnung der mRNA-Sekundärstruktur erfolgte unter Verwendung des FOLD-Programms (Zuker et al. Science, 244, 48-52, 1989), welches an eine Sequenzlänge von bis zu 2 kb angepaßt war.

Um diese Voraussage zu verifizieren, wurden enzymatische Sekundärstrukturuntersuchungen durchgeführt, wobei sowohl die komplette mRNA als auch Fragmente aus dem 5'-Ende umfassend 47, 36 und 23 Basen verwendet wurden. Diese Experimente zeigten identische Muster von einzel- und doppelsträngigen spezifischen Spaltstellen, was eine identische Struktur für die Position -30 bis -7 anzeigte. Aufgrund der Experimente mit dem kleinsten Fragment von 23 Basen konnte die Struktur als Haarnadel (hairpin) identifiziert werden (Abb. 1). Neben einem kurzen Stamm von 4 Basenpaaren, verantwortlich dafür, die Haarnadel zu schließen, wurden zusätzliche helikale Schnitte innerhalb der vorausgesagten einzelsträngigen Schleife beobachtet, die ein strukturiertes Element anzeigten. Aufgrund dieser Daten wurde die Sekundärstruktur der Haarnadel durch Einführung zusätzlicher Basenpaare verfeinert.

Die Existenz der Nukleoside G (-30) bis G (-28) ist kritisch für die Bildung dieser Haarnadel, wie oben im Zusammenhang mit ihrer Relevanz für die Translationseffizienz diskutiert. Die Korrelation von funktionellen Ergebnissen und strukturellen Erfordernissen beweist die Existenz einer funktionalen Region innerhalb der CETP-mRNA, die als Haarnadelstruktur innerhalb des 5'-Endes der CETP-mRNA beschrieben werden kann, wie sie durch die Ermittlung der korrekten Transkriptionsstartstelle und enzymatischen Sekundärstrukturuntersuchungen bestimmt wurde.

Testsysteme für das CETP-mRNA-Zielmolekül: Ein Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren für die Verwendung von CETP-mRNA als Zielmolekül für die Musterung von Verbindungen mit antiatherogener Aktivität. Drei verschiedene Tests sind in der Erfindung eingeschlossen die einzeln oder in Kombination verwendet werden können:

Ein funktioneller Test, der die Translationseffizienz mißt und auf der Menge des synthetisierten Proteins basiert, wird in einem zellfreien in-vitro System durchgeführt, das Retikulozytenlysats, ein Aminosäuregemisch und CETP-mRNA enthält. Einzelheiten einer möglichen Ausführungsform dieses Tests, der im Hochdurchsatzmusterungsformat (high throughput screening, HTS-Format) verwendet werden kann, werden in Beispiel 4 erläutert.

Zusätzlich zu diesem funktionellen in-vitro-Test kann auch ein funktioneller zellbasierter Test verwendet werden, um insbesondere zwei Aspekte abzudecken:

1. In der Umgebung einer lebenden Zelle werden mRNAs im Hinblick auf Prozessierung, Transport, Lokalisierung und Stabilisierung streng reguliert. Während dieser Prozesse wechselwirken sie mit einer Vielzahl von Proteinen und RNPs, die möglicherweise Unterschiede in der Zielmolekülstruktur oder Zugänglichkeit bewirken und in einer in-vitro-Umgebung falsche Signale ergeben können.
2. Für den Antisense-Ansatz sind die Bioverfügbarkeit und der intrazelluläre Transport der Oligonukleotide kritische Faktoren (J. Clin. Invest., 95, 1814–1823, 1995). Der Einfluß dieser Fragen auf die CETP-Expression sollte auch in einem zellbasierten Test geklärt werden.

Als ein mögliches Werkzeug, die in-vivo-Aktivität zu verifizieren, wird ein funktioneller zellulärer Test in Beispiel 5 beschrieben, der auf der CETP-Biosynthese in lebenden HepG2 Zellen beruht.

Boten-RNAs (mRNAs) sind Moleküle mit einer mehr als 6-fachen Größe im Vergleich zu den korrespondierenden Proteinen. Deshalb sind mehr Bindungsmotive möglich, und die Regioselektivität einer Verbindung, die die Translation moduliert, gewinnt an Wichtigkeit. Um ein Werkzeug für die Verifizierung der Bindungsstelle bereitzustellen, z. B. der Haarnadelstruktur in der 5'-nicht-kodierenden Region der CETP-mRNA, wird mit der vorliegenden Erfindung ein Bindungstest bereitgestellt, der auf der BIAcore-Technologie (Biomolekulare Interaktions-Analyse) basiert. Dieser Test wurde für das 5'-Ende der CETP-mRNA verwendet (Beispiel 6), kann jedoch für jedes identifizierte nukleotidische Strukturmotiv angepaßt werden.

Die Durchführbarkeit aller Tests wurde für nukleinsäure-bindende Oligonukleotide auf DNA-, RNA- und Phosphorothioat-Basis gezeigt. Die Durchführbarkeit der funktionalen Tests wurde zusätzlich für Hammerkopf-Ribozyme gezeigt. Alle Tests können für die Optimierung von nukleinsäure-bindenden Oligonukleotiden ebenso wie für die Hochdurchsatzmusterung von kleinen nicht-nukleotidischen Verbindungen mit Molekulargewichten von in der Regel weniger als 2000 g/mol verwendet werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden CETP-translationsinhibierende Verbindungen, entweder nukleinsäure-bindende Oligonukleotide oder nicht-nukleotidische Verbindungen, in einem ersten funktionellen HTS selektiert, wie in Beispiel 4 beschrieben wird. Nach der Bestätigung der Aktivität durch einen anschließenden zellbasierten Test (Beispiel 5) kann ein Bindungstest (Beispiel 6) ausgeführt werden, um die Regioselektivität des Bindungsmodus zu bestätigen. So identifizierte Inhibitoren der Translation von CETP-mRNA sind für die Behandlung oder Prophylaxe von Atherosklerose bzw. Gefäßerkrankungen, bei denen CETP-Expression eine pathogene Rolle spielt, geeignet. Solche Verbindungen können in strukturellen Begriffen als nukleinsäure-bindende Nukleinsäuren oder als jede nicht-nukleotidische Verbindung mit einem niedrigen Molekulargewicht (MW<2000) beschrieben werden.

Nukleinsäure-bindende Oligonukleotide werden vorzugsweise parenteral (intravenös, subkutan, intraperitoneal oder intramuskulär), inhalativ, oder topisch (intranasal oder rectal) verabreicht. Die hierfür benutzten pharmazeutischen Formulierungen können beispielsweise Wasser, Puffer, Lösungsmittel, Trägermaterialien oder Konservierungsmittel enthalten.

Formulierungen als sterile wäßrige Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen mit optionalen Additiven wie Puffer oder Lösungsmittel können beispielsweise für parenterale oder inhalative Anwendungen benutzt werden. Liposomale Formulierungen von Wirkstofflösungen oder -suspensionen sind als parenterale, inhalative oder topische Verabreichungsform geeignet. Formulierungen als Feststoff oder Puder sind zusätzlich bei inhalativen oder topischen Anwendungen, Formulierungen als Salbe, Lotion, Creme, Gel oder Suppositorium bei topischen Anwendungen geeignet.

Die Gabe des Wirkstoffes erfolgt einmal oder mehrmals je Tag und wird so bemessen, daß ein therapeutischer Blutspiegel von 2 nM–100 µM erreicht wird. Optimale Dosierung, Dosierungsformen sowie der geeignete zeitliche Abstand zwischen den Gaben kann von entsprechend erfahrenen Personen leicht ermittelt werden.

#### Abbildungen

**Fig. 1** Abb. 1 zeigt die Sekundärstruktur der 5'-nicht-kodierenden Region (5'-UTR), abgeleitet aus theoretischen Voraussagen und Bindungsexperimenten. Die Wirkung nukleinsäure-bindender Oligonukleotide, die gegen diese Struktur gerichtet sind, zeigt ihre funktionelle Wichtigkeit.

–26 bis 3: ID 1 0.4 µM –59% Translation  
–26 bis –12: ID 12 1.2 µM –63% Translation  
–24 bis –13: ID 5 1.2 µM –34% Translation

Testbedingungen: Translation für eine Stunde bei 37°C mit Kaninchen-Retikulozytenlysat (Promega).

**Fig. 2** Abb. 2 zeigt die Autoradiographie, die ein Sequenzlerungsexperiment der menschlichen CETP-mRNA darstellt. Die Identität des 5'-Endes wird durch die Existenz eines zusätzlichen Cap-G in Position-1 bestätigt.

**Fig. 3** Abb. 3 faßt die Ergebnisse der enzymatischen Strukturuntersuchungen zusammen, die mit der CETP-mRNA ausgeführt wurden, um die 5'-UTR-Sekundärstruktur zu identifizieren.

**Fig. 4** Abb. 4 stellt die Inhibition der CETP-Synthese in HepG2 Zellen in Abhängigkeit bereitgestellter nukleinsäure-bindender Oligonukleotide dar. Der zellbasierte Translationstest, der hier verwendet wurde, ist in Beispiel 5 beschrieben.

**Fig. 5** Abb. 5 stellt die Inhibition der CETP-Translation in Abhängigkeit von bereitgestellten nukleinsäure-bindenden Oligonukleotiden dar. Der in-vitro Translationstest, der hier verwendet wurde, ist in Beispiel 2 beschrieben.

**Fig. 6** Abb. 6 stellt ein Oberflächen-Plasmonresonanzspektrum eines 9 Basen langen nukleinsäure-bindenden (antisense) Oligonukleotids mit der Sequenz SEQ ID NO: 3 an das 5'-Ende (Positionen –30 bis 6 der SEQ ID NO: 14) der humanen CETP-mRNA unter Anwendung der BIAcore®-Technologie dar.

## Beispiele

## Beispiel 1

## Primärstruktur der 5'-nichttranslatierten Region (5'-UTR) der CETP-mRNA

5

Das 5'-Ende der menschlichen CETP-mRNA wurde durch 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) bestimmt. PolyA(+)-RNA von HepG2-Zellen (ATCC HB-8065) wurde mit dem Quiagen Oligotex Kit entsprechend den Angaben des Herstellers hergestellt (Quiagen, Hilden/Deutschland; siehe auch Kuribayashi, K., Hikata, M., Miyamoto, C. and Furuchi, Y. (1988), Nuc. Acids Res. Symp. Series No. 19, 61–64.). 250 ng der mRNA wurde mit einem CETP-spezifischen nukleinsäure-bindenden Oligonukleotid komplementär zu den Nukleotiden 159–184 der kodierenden Sequenz [Sequenz: CCG TGA TAT CTG GGT AGC TGG CTC GC] und 2 U Retrotherm-Polymerase (Biozym Diagnostic GmbH, Hess. Oldendorf/Deutschland) revers transkribiert. Ein zweites Oligonukleotid (Anker(anchor)-Oligonukleotid aus dem 5'-AmpliFINDER RACE KIT, Clontech, Palo Alto/CA/USA) wurde durch T4-RNA-Ligase an das 3'-Ende ligiert. Die spezifische cDNA wurde mit PCR amplifiziert, wobei das Anker-Oligonukleotid und ein Oligonukleotid komplementär zur Position 115–141 [Sequenz CAC CTT GGC AGT CTC GTG GTT CAA CAC] der die CETP-mRNA kodierenden Sequenz verwendet wurden. Die PCR-Fragmente wurden kloniert und sequenziert. Die Grenze des Anker-Oligonukleotides markiert das 5'-Ende der originalen cDNA. Reverse Transkription einer kompletten mRNA führt zu einem zusätzlichen Guanosin-Rest am 5'-Ende, der in der genomischen Sequenz nicht gefunden werden kann und von der Cap-Struktur stammt (Hirzmann et al., 1993, Nucleic Acids Res., 21, 3597–3598). Solch ein zusätzliches Guanosin zwischen dem Anker-Oligonukleotid und der CETP-Sequenz definiert klar das tatsächliche 5'-Ende einer mRNA.

Die Untersuchung der CETP-mRNA aus HepG2 Zellen, die von menschlichen Leberzellen abgeleitet sind, ergab, daß in mehr als 80% die 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) der CETP-mRNA Moleküle bei Position –30 der genomischen Sequenz beginnt (relativ zum ersten Nukleotid des Startcodons AUG, das als +1 gesetzt wird). Nur eine Minderheit der Moleküle hatte ein 5'-UTR von 60 Nukleotiden oder länger. Im Gegensatz dazu war in der Literatur eine RNA Startposition bei –27 berichtet worden (Agellon et al. (1990), Biochemistry 29, 1372–1376), die nicht gefunden wurde.

## Beispiel 2

## Translationseffizienz verschiedener CETP-mRNA Konstrukte

30

Konstrukte für die Erzeugung von RNA wurden an den Promotor der T7-RNA-Polymerase fusioniert und in die Mehrfach-Klonierungsstelle des Vektors pUC18 (Boehringer Mannheim, Mannheim/Deutschland) kloniert.

RNA definierter Länge wurde nach Linearisierung des Plasmides mit dem RiboMAX Transkriptionssystem (Promega; Madison/WI/USA) gemäß den Herstellerangaben synthetisiert. RNA mit einer 5'-Cap-Struktur wurde mit dem mMES-SAGE mMACHINE kit (Ambion, Austin/TX/USA) gemäß Herstellerangaben synthetisiert.

Für die in-vitro-Translation wurde die RNA für 1 Stunde bei 37°C mit 16.5 µl Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate (Promega) und 10 µCi L-[<sup>35</sup>S]-Methionin (1000 Ci/mmol) in einem Gesamtvolumen von 25 µl inkubiert. Das radiomarkierte Translationsprodukt wurde präzipitiert, durch Filtration auf Glasfibrern gewonnen und durch Szintillationsmessung quantifiziert.

Die Translationseffizienz der beiden CETP-mRNAs, die mit Position –30 bzw. –27 beginnen, wurde in einem in-vitro-Translationssystem verglichen. RNA mit der Fähigkeit, die Haarnadelstruktur zu bilden, erzeugte zweimal soviel Protein wie die RNA, die mit Position –27 startete. Dieser Verstärkungseffekt war unabhängig von der Anwesenheit einer Cap-Struktur. Die Zugabe einer Cap-Struktur ergab eine effizientere Translation beider RNA-Typen, aber die zweifache Differenz zwischen den beiden RNAs blieb bestehen.

Die 5'-UTR von CETP plus die ersten 48 Nukleotide der kodierenden Region wurden an eine NarI-Restriktionsstelle an Position +33 der Luciferase-cDNA fusioniert. Das resultierende chimäre Protein ist hauptsächlich Luciferase mit einem Austausch der ersten 10 Aminosäuren gegen 16 aminoterminal Aminosäuren von CETP. RNA von diesem Konstrukt war in der Lage, die angenommene 5'-Haarnadelstruktur zu bilden.

Die Translationseffizienz der chimären RNA wurde mit der von unveränderter Luciferase-RNA verglichen. Eine Verstärkung der translationalen Effizienz von etwa 50% wurde beobachtet, unabhängig ob eine Cap-Struktur vorhanden war oder nicht.

## Beispiel 3

## Enzymatische Sekundärstrukturuntersuchungen der funktionellen Domäne innerhalb der CETP-mRNA und künstlichen Modellsystemen

55

Die Gegenwart von wenigsten 30 Nukleotiden des 5'-UTR erlaubt die Bildung einer Haarnadelstruktur am extremen 5'-Ende der mRNA. Um die Haarnadelstruktur dieser Region zu bestätigen, wurden enzymatische Sekundärstrukturuntersuchungen ausgeführt.

Für die strukturelle Analyse der CETP-mRNA wurden in-vitro-Transkripte durch Inkubation mit zwei Einheiten alkalischer Phosphatase aus Kalbsdünndarm (Stratagene, La Jolla/CA/USA) bei 50°C für 45 Minuten dephosphoryliert und wie beschrieben (Göringer et al. (1984) Eur. J. Biochem. 114, 25–34) 5'-endmarkiert. RNA-Oligonukleotide wurden direkt nach der Reinigung entweder 5'- oder 3'-endmarkiert. Ein partieller enzymatischer Abbau der gereinigten, markierten RNA wurde durchgeführt, wobei mit 1 bis 5 U der Nuklease S1 (Boehringer Mannheim, Mannheim/Deutschland), 0.1 bis 1 U der Nuklease T1 (USB, Cleveland/OH/USA), 0.15 bis 0.25 U der Nuklease CL3 (USB) oder 0.01 bis 0.1 mU des Kobragiftenzym V1 (USB) in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 10 Minuten bei 37°C inkubiert wurden. Die mo-

difizierten Produkte wurden auf einem 10–15%igen Polyacrylamid/7M-Harnstoff-Gel separiert und durch Autoradiographie detektiert.

Die Ergebnisse der enzymatischen Sekundärstrukturuntersuchung sind in guter Übereinstimmung mit der vorgeschlagenen Haarnadelstruktur (Abb. 3). Die gleiche Struktur wurde bestätigt für RNA-Fragmente, die aus den ersten 50, 36 und 23 Nukleotiden der CETP-mRNA bestehen.

#### Beispiel 4

Hochdurchsatzmusterungstest (High throughput screening) für in-vitro-Translation von CETP-mRNA und Inhibierung durch nukleinsäure-bindende Oligonukleotide

Die cDNA von menschlichem CETP im Bereich von –30 bis +1657 wurde mit dem Promotor der T7-RNA-Polymerase fusioniert und in einen pUC18-abgeleiteten Plasmidvektor (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour 1989, S. 1.13) kloniert. Nach Linearisierung des Plasmides mit NotI wurde die CETP-mRNA durch Transkription in vitro mit T7-RNA-Polymerase und dem RiboMAX Large Scale RNA Production System-T7 (Promega) synthetisiert.

Die in-vitro-Translation wurde in Mikrotiterplatten im 96-Loch-Format ausgeführt. CETP-mRNA (0.5 µg) wurde für 15 Minuten bei 37°C mit Oligonukleotid, Testsubstanz oder Wasser präinkubiert. Dann wurde Retikulozytenlysat, Aminosäuremischung (1 mM minus Leucin) und 1 µCi L-[3,4,5-<sup>3</sup>H(N)]-Leucin zugegeben und die Mischung bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Für den Nachweis von radiomarkiertem CETP wurde jede Probe mit destilliertem H<sub>2</sub>O zehnfach verdünnt und auf eine Anti-Maus-Flashplate Plus (NEN, Bad Homburg/Deutschland) transferiert. Ein muriner monoklonaler Antikörper, der für CETP spezifisch ist (TP2, Yen et al. [1989] J.Clin.Invest. 83, 2018–2024), wurde zugegeben, und die Platte für wenigstens 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde das Medium abgesaugt, jedes Loch mit PBS (80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O add. 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,4) gewaschen, und die Platte für wenigstens 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde die Platte in einem β-Zähler ausgewertet.

#### Beispiel 5

##### Inhibierung von CETP-Translation in Zellkultur

Die menschliche Hepatomazelllinie HepG2 (ATCC HB-8065) dient als Modellsystem für die Untersuchung von Inhibitoren von CETP Expression in Zellkultur.

HepG2-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät und in MEM mit 10% FKS bis zur Subkonfluenz gezüchtet. Oligonukleotide wurden mit einem gleichen Volumen einer kationischen Lipidmischung (LipofectAMINE Transfection Reagents, Life Technologies, Gaithersburg/MD/USA) gemischt. Der Oligonukleotid-Lipid-Komplex wurde 1 : 5 (v/v) mit Medium verdünnt, um die angegebene Konzentration von Oligonukleotid einzustellen, und die Zellen wurden mit 625 µl dieser Mischung für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurden 3 ml Medium zugegeben und die Zellen wurden für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Periode wurde die Konzentration von CETP im Medium mit Hilfe eines Radioimmuntests (RIA) mit dem Monoklonalen Antikörper TP2 bestimmt.

#### Beispiel 6

Testsystem zur Messung der Bindung von nukleinsäure-bindenden Oligonukleotiden oder anderen Verbindungen an eine Ziel-RNA

Oberflächen-Plasmon-Resonanz ist das Grundprinzip der BIAcore-Technologie (Pharmacia Biosensor) zur Beobachtung molekularer Wechselwirkungen auf der Oberfläche eines Microchips. Mehrfach(multispot)-Messungen mit Hilfe eines BIAcore-2000 Instruments (BIAcore AB, Uppsala/Schweden; Karlsson et al. 1995, Anal. Biochem. 228, 274–280) wurde hier durchgeführt, um Bindungsereignisse zwischen RNA und Oligonukleotiden zu messen.

Ein 5'-biotinyliertes RNA-Oligonukleotid, das das 5'-Ende der CETP-mRNA (Position –30 bis 6) repräsentiert, wurde über Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen auf einem kommerziell erhältlichen Mikrochip SA5 (Pharmacia Biosensor) immobilisiert. Der Chip enthält 4 verschiedene Flußzellen, die durch eine Probe entweder individuell oder seriell adressiert werden können. In verschiedenen Flußzellen wurden unterschiedliche Mengen von Oligonukleotid immobilisiert, um einen vierstufigen Gradienten zu erzeugen. Es ist zu erwarten, daß die Amplitude eines Bindungsereignisses von der Menge des immobilisierten Oligonukleotides abhängt, während unspezifische Effekte unabhängig vom Immobilisierungsgrad auftreten sollten.

Um den Gradienten zu erzeugen, wurde jede individuelle Flußzelle mit einer Oligonukleotidlösung einer jeweils anderen Konzentration (0, 6, 2.5 oder 1.3 µg/ml) für 5 Minuten mit einer Flußrate von 5 µl/min injiziert.

Um die Wechselwirkung der nukleinsäure-bindenden Oligonukleotide mit der immobilisierten RNA zu messen, wurde das nukleinsäure-bindende Oligonukleotid in Laufpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Natrium-Azid) verdünnt, für 3 Minuten bei einer Flußrate von 5 µl/min. geladen, und dann das System bei der gleichen Flußrate mit Laufpuffer gewaschen. Die Bindung eines nukleinsäure-bindenden Oligonukleotides resultiert in einem Anstieg in Resonanzeinheiten gegenüber Hintergrund (keine RNA immobilisiert), die der Menge an immobilisierter RNA entspricht. Als Beispiel ist die Bindung eines 9 Basen langen nukleinsäure-bindenden RNA-Oligonukleotides (Sequenz ID NO 3) in Abb. 6 gezeigt.



## (1) Allgemeine Angaben:

- (i) Anmelder: Dr. Karl Thomae GmbH  
(ii) Bezeichnung der Erfindung: Cholesterylester-Transferprotein (CETP)-  
mRNA als Zielmolekül in der Therapie von Atherosklerose  
(iii) Anzahl der Sequenzen: 14

## (2) Angaben zur SEQ ID NO 1: CETP mRNA Position -26 bis 3

## (i) Sequenzkennzeichen:

- (A) Länge: 30 Basen  
(B) Art: Nukleotid  
(C) Strangform: einfach  
(D) Topologie: linear  
(ii) Hypothetisch: nein  
(iii) Antisense: ja  
(iv) Molekülart: DNA

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 1:

5'-GCATG GTTAT CAGGC AGTGG TGTGT AAGTG-3'

## (2) Angaben zur SEQ ID NO: 2: CETP mRNA Position -18 bis 2

## (i) Sequenzkennzeichen:

- (A) Länge: 18 Basen  
(B) Art: Nukleotid  
(C) Strangform: einfach  
(D) Topologie: linear  
(ii) Hypothetisch: nein  
(iii) Antisense: ja  
(iv) Molekülart: DNA

## (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 2:

5' -CATGG TTATC AGGCA GTG-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 3: CETP mRNA Position -23 bis 15

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 9 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: einfach

(D) Topologie: linear

(ii) Hypothetisch: nein

(iii) Antisense: ja

(iv) Molekülart: RNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 3:

5' -GGUGU GUAA-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 4: CETP mRNA Position 568 bis 584

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 17 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: einfach

(D) Topologie: linear

(ii) Hypothetisch: nein

(iii) Antisense: ja

(iv) Molekülart: RNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 4:

5' -GACCA GCUUC AGGGU GA-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 5: CETP mRNA Position -24 bis -13

(i) Sequenzkennzeichen:

- (A) Länge: 12 Basen  
 (B) Art: Nukleotid  
 (C) Strangform: einfach 5  
 (D) Topologie: linear  
 (ii) Hypothetisch: nein  
 (iii) Antisense: ja 10  
 (iv) Molekülart: RNA  
 (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 5: 15

5'-GUGGU GUGUA AG-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 6: CETP mRNA Position 64 bis 71 25

- (i) Sequenzkennzeichen:  
 (A) Länge: 8 Basen  
 (B) Art: Nukleotid 30  
 (C) Strangform: einfach  
 (D) Topologie: linear 35  
 (ii) Hypothetisch: nein  
 (iii) Antisense: ja  
 (iv) Molekülart: RNA 40  
 (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 6: 45

5'-GUGCG AGG-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 7: CETP mRNA Position -11 bis 4 50

- (i) Sequenzkennzeichen: 55  
 (A) Länge: 37 Basen  
 (B) Art: Nukleotid  
 (C) Strangform: einfach 60  
 (D) Topologie: Hammerkopf  
 (ii) Hypothetisch: nein  
 (iii) Antisense: ja 65

(iv) Molekülart: gemischte DNA/RNA-Sequenzen; 3'-ddC

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 7:

5'-dAGCATGG rUCUGAUGA dGTCCGTGAGGAC rGAAA dTCAGG ddC-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 8: CETP mRNA Position 9 bis 24

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 37 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: einfach

(D) Topologie: Hammerkopf

(ii) Hypothetisch: nein

(iii) Antisense: ja

(iv) Molekülart: gemischte DNA/RNA-Sequenzen; 3'-ddC

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 8:

5'-dGGGTCA rGCUGAUGA dGTCCGTGAGGAC rGAAA dCTGTGG ddC-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 9: CETP mRNA Position 168 bis 183

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 37 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: einfach

(D) Topologie: Hammerkopf

(ii) Hypothetisch: nein

(iii) Antisense: ja

(iv) Molekülart: gemischte DNA/RNA-Sequenzen; 3'-ddA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 9:

5'-dCCGTG rACUGAUGA dGTCCGTGAGGAC rGAAA dTCTGGGT ddA-3'

## (2) Angaben zur SEQ ID NO: 10: CETP mRNA Position 743 bis 760

- (i) Sequenzkennzeichen: 5
- (A) Länge: 39 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: einfach 10
- (D) Topologie: Hammerkopf
- (ii) Hypothetisch: nein
- (iii) Antisense: ja 15
- (iv) Molekülart: gemischte DNA/RNA-Sequenzen; 3'-ddA
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 10: 20

5'-dATGAAA rUCUGAUGA dGTCCGTGAGGAC rGAAA dCCCTTGTG ddA-3'

25

## (2) Angaben zur SEQ ID NO: 11: CETP mRNA Position 1584 bis 1594

30

- (i) Sequenzkennzeichen:
- (A) Länge: 17 Basen
- (B) Art: Nukleotid 35
- (C) Strangform: einfach
- (D) Topologie: linear 40
- (ii) Hypothetisch: nein
- (iii) Antisense: ja
- (iv) Molekülart: RNA 45
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 11: 50

5'-UCUCC AUCUC CGUAC UC-3'

50

55

## (2) Angaben zur SEQ ID NO: 12: CETP mRNA Position -26 bis -12

- (i) Sequenzkennzeichen: 60
- (A) Länge: 15 Basen
- (B) Art: Nukleotid
- (C) Strangform: einfach 65

(D) Topologie: linear

(ii) Hypothetisch: nein

(iii) Antisense: ja

(iv) Molekülart: RNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 12:

5'-AGUGG UGUGU AAGUG-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 13: CETP mRNA Position 753 bis 768

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 16 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: einfach

(D) Topologie: linear

(ii) Hypothetisch: nein

(iii) Antisense: ja

(iv) Molekülart: RNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 13:

5'-UCUUG UAGAU GAAAU G-3'

(2) Angaben zur SEQ ID NO: 14: DNA zu humaner CETP mRNA

(i) Sequenzkennzeichen:

(A) Länge: 1687 Basen

(B) Art: Nukleotid

(C) Strangform: einfach

(D) Topologie: linear

(ii) Hypothetisch: nein

(iii) Antisense: nein

(iv) Molekülart: DNA

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID NO: 14:

# DE 197 31 609 A 1

-30 GGGCCACTTA CACACCACTG CCTGATAACC ATGCTGGCTG CCACAGTCCT  
 GACCCTGGCC  
 30 CTGCTGGGCA ATGCCCATGC CTGCTCCAAA GGCACCTCGC ACGAGGCAGG 5  
 CATCGTGTGC  
 90 CGCATCACCA AGCCTGCCCT CCTGGTGTTC AACCACGAGA CTGCCAAGGT 10  
 GATCCAGACC  
 150 GCCTTCCAGC GAGCCAGCTA CCCAGATATC ACGGGCGAGA AGGCCATGAT  
 GCTCCTTGGC  
 210 CAAGTCAAGT ATGGGTGCA CAACATCCAG ATCAGCCACT TGTCCATCGC 15  
 CAGCAGCCAG  
 270 GTGGAGCTGG TGGAAGCCAA GTCCATTGAT GTCTCCATTC AGAACGTGTC 20  
 TGTGGTCTTC  
 330 AAGGGGACCC TGAAGTATGG CTACACCACT GCCTGGTGGC TGGGTATTGA  
 TCAGTCCATT  
 390 GACTTCGAGA TCGACTCTGC CATTGACCTC CAGATCAACA CACAGCTGAC 25  
 CTGTGACTCT  
 450 GGTAGAGTGC GGACCGATGC CCCTGACTGC TACCTGTCTT TCCATAAGCT 30  
 GCTCCTGCAT  
 510 CTCCAAGGGG AGCGAGAGCC TGGGTGGATC AAGCAGCTGT TCACAAATTT  
 CATCTCCTTC  
 570 ACCCTGAAGC TGGTCCTGAA GGGACAGATC TGCAAAGAGA TCAACGTCAT 35  
 CTCTAACATC  
 630 ATGGCCGATT TTGTCCAGAC AAGGGCTGCC AGCATCCTTT CAGATGGAGA 40  
 CATTGGGGTG  
 690 GACATTTCCC TGACAGGTGA TCCCGTCATC ACAGCCTCCT ACCTGGAGTC  
 CCATCACAAG  
 750 GGTCATTTCA TCTACAAGAA TGTCTCAGAG GACCTCCCCC TCCCCACCTT 45  
 CTCGCCCACA  
 810 CTGCTGGGGG ACTCCCGCAT GCTGTACTTC TGGTTCTCTG AGCGAGTCTT 50  
 CCACTCGCTG  
 870 GCCAAGGTAG CTTTCCAGGA TGGCCGCCTC ATGCTCAGCC TGATGGGAGA  
 CGAGTTCAAG  
 930 GCAGTGCTGG AGACCTGGGG CTTCACACC AACCAGGAAA TCTTCCAAGA 55  
 GGTGTGCGGC  
 990 GGCTTCCCCA GCCAGGCCCA AGTCACCGTC CACTGCCTCA AGATGCCCAA 60  
 GATCTCCTGC  
 1050 CAAAACAAGG GAGTCGTGGT CAATTCTTCA GTGATGGTGA AATTCTCTT 65  
 TCCACGCCCA

1110 GACCAGCAAC ATTCTGTAGC TTACACATT GAAGAGGATA TCGTGACTAC  
 CGTCCAGGCC  
 5 1170 TCCTATTCTA AGAAAAAGCT CTTCTTAAGC CTCTTGGATT TCCAGATTAC  
 ACCAAAGACT  
 1230 GTTTCCAACT TGACTGAGAG CAGCTCCGAG TCCATCCAGA GCTTCCTGCA  
 10 GTCAATGATC  
 1290 ACCGCTGTGG GCATCCCTGA GGT CATGTCT CGGCTCGAGG TAGTGTTTAC  
 AGCCCTCATG  
 15 1350 AACAGCAAAG GCGTGAGCCT CTTGACATC ATCAACCCTG AGATTATCAC  
 TCGAGATGGC  
 1410 TTCCTGCTGC TGCAGATGGA CTTTGGCTTC CCTGAGCACC TGCTGGTGA  
 20 TTTCCTCCAG  
 1470 AGCTTGAGCT AGAAGTCTCC AAGGAGGTCG GGATGGGGCT TGTAGCAGAA  
 GCCAAGCACC  
 25 1530 AGGCTCACAG CTGGAACCT GGTGTCTCCT CCAGCGTGGT GGAAGTTGGG  
 TTAGGAGTAC  
 1590 GGAGATGGAG ATTGGCTCCC AACTCCTCCC TATCCTAAAG GCCCACTGGC  
 30 ATTAAAGTGC  
 1650 TGTATCC

# 35 Patentansprüche

1. Transkript des menschlichen Cholesterylester-Transferprotein(CETP)-Gens, dadurch charakterisiert, daß es eine 5'-nichttranslatierte Region mit einer regulatorischen Sequenz enthält.
2. Transkript nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Sequenz eine Haarnadelstruktur (hairpin) hat.
3. Transkript nach Anspruch 1 oder 2, dadurch charakterisiert, daß es eine 5'-nichttranslatierte Region von mindestens 30 Nukleotiden enthält.
4. Transkript nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß seine 5'-nichttranslatierte Region mit der Nukleotidsequenz GGGCCACUU beginnt.
- 45 5. Transkript nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß seine 5'-nichttranslatierte Region die Nukleotidsequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC enthält.
6. Transkript nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens 80% der menschlichen CETP-mRNA repräsentiert.
7. Transkript nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß es das Transkript einer DNA darstellt, die die Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 14. oder eine allele Variante dieser Sequenz hat oder enthält.
- 50 8. Transkript nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es eine CAP-Struktur hat.
9. Ribonukleinsäure, entsprechend einer DNA, die die Sequenz SEQ ID NO: 14 oder einer allelen Variante dieser Sequenz oder einen Teil dieser Sequenzen hat oder enthält, wobei diese Ribonukleinsäure mindestens die Sequenz GGGCCACUU enthält.
- 55 10. Ribonukleinsäure nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens die Sequenz GGGCCA-CUUA CACACCACUG CCUGAUAACC enthält.
11. Ribonukleinsäure nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie wenigstens einen Teil der translatierten Region des menschlichen CETP-Gens enthält.
12. Ribonukleinsäure nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens 90% der menschlichen CETP-mRNA repräsentiert.
- 60 13. Ribonukleinsäure nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein Transkript einer DNA darstellt, die die Nukleotidsequenz SEQ ID NO: 14. hat oder enthält.
14. Ribonukleinsäure nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine CAP-Struktur hat.
15. Verwendung eines Transkriptes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 oder einer Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14 zum Auffinden von Substanzen, die die CETP-Expression inhibieren können.
- 65 16. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die CETP-Expression inhibieren können, dadurch gekennzeichnet, daß gemessen wird, ob eine Testsubstanz an die 5'-nichttranslatierte Region eines Transkriptes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 binden kann.



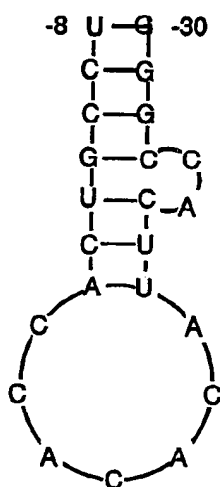
17. Verfahren zum Auffinden von Substanzen, die die CETP-Expression inhibieren können, dadurch gekennzeichnet, daß die Translationsrate eines Transkriptes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 in Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen wird.
18. Verfahren nach Anspruch 17 dadurch gekennzeichnet, daß es ein zellfreies oder ein zellbasiertes Verfahren ist.
19. Verfahren nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge des synthetisierten Proteins in einem zellfreien in-vitro-System gemessen wird, das Retikulozytenisat, Aminosäuren und ein Transkript gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 enthält.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß es in einem Hochdurchsatz-Musterungs- (High Throughput-Screening, IHS)-Format ausgeführt wird.
21. Substanz, die die CETP-Expression inhibieren kann, erhältlich mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 17 bis 20.
22. Substanz nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie ein nukleinsäurebindendes (antisense) Oligonukleotid oder eine nicht-nukleotidische Verbindung ist.
23. Substanz nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie an die 5'-nichttranslatierte Region eines Transkriptes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 binden kann.
24. Substanz nach einem der Ansprüche 21 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie an die Sequenz GGGCCA-CUUA CACACCACUG CCU binden kann.
25. Substanz nach einem der Ansprüche 21 bis 24 zur pharmazeutischen Verwendung.
26. Verwendung einer Substanz gemäß einem der Ansprüche 21 bis 24 zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Gefäßkrankheiten, bei denen CETP eine pathogene Rolle spielt, insbesondere Atherosklerose.
27. Nukleinsäure-bindendes (antisense) Oligonukleotid, das an die 5'-nichttranslatierte Region eines Transkriptes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 binden kann.
28. Oligonukleotid nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß es mit der 5'-nichttranslatierte Region eines Transkriptes gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8 oder einer Ribonukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 9 bis 14 oder einem Abschnitt davon hybridisiert, insbesondere in einem physiologischen Milieu.
29. Oligonukleotid nach Anspruch 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, daß es aus mindestens 7 und höchstens 50 Nukleotiden besteht.
30. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß es aus mindestens 10 und höchstens 35 Nukleotiden besteht.
31. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß es aus mindestens 7 Nukleotiden besteht und die Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 oder SEQ ID NO: 12 oder einen Teils einer dieser Sequenzen hat oder enthält.
32. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß es an die Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCUGAUAACC AUGC binden kann.
33. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß es an die Sequenz GGGCCACUUA CACACCACUG CCU binden kann.
34. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß es DNA oder RNA ist oder eine effektives Derivat davon ist.
35. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß es stabilisiert ist.
36. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 35, dadurch gekennzeichnet, daß es 3'-Didesoxynukleoside und/oder 3',3'-Inversionen, und/oder Phosphorthioat-, und/oder 2'-Methoxynukleoside- und/oder Methylphosphonat-Derivate enthält.
37. Oligonukleotid nach einem der Ansprüche 27 bis 36 zur pharmazeutischen Verwendung.
38. Verwendung eines Oligonukleotids gemäß einem der Ansprüche 27 bis 37 zur prophylaktischen oder therapeutischen Behandlung von Gefäßkrankheiten, insbesondere Atherosklerose.
39. Verfahren zur Messung der Bindung einer Substanz an eine Nukleinsäure, dadurch gekennzeichnet, daß es auf dem Effekt der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (Surface Plasmon Resonance, SPR) beruht.
40. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß dabei die Biomolekulare Interaktions-Analyse (BIA) angewendet wird.
41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, daß dafür das BIAcore®-System verwendet wird.
42. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß die getestete Substanz eine nukleotidische Verbindung ist.
43. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß die getestete Substanz eine nicht-Nukleotid-Verbindung mit einem Molekulargewicht von mindestens 250 g/mol und weniger als 2000 g/mol ist.
44. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 42, dadurch gekennzeichnet, daß die getestete Substanz eine DNA, RNA oder ein Oligonukleotid mit 3'-Didesoxynukleoside und/oder 3',3'-Inversionen, und/oder Phosphorthioat-, und/oder 2'-Methoxynukleoside- und/oder Methylphosphonat-Derivate ist.

---

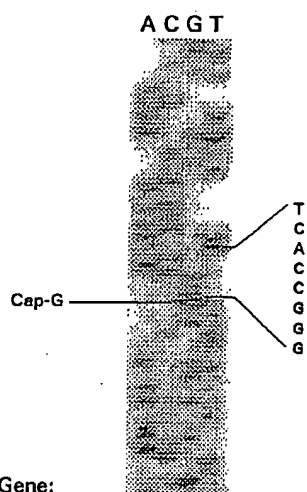
Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -



**Fig. 1**



5'-Sequence of CETP Gene:

GAA CGC CTC GGG CCA CTT ACA CAC CAC TGC CTG ATA ACC ATG

*Fig. 2*

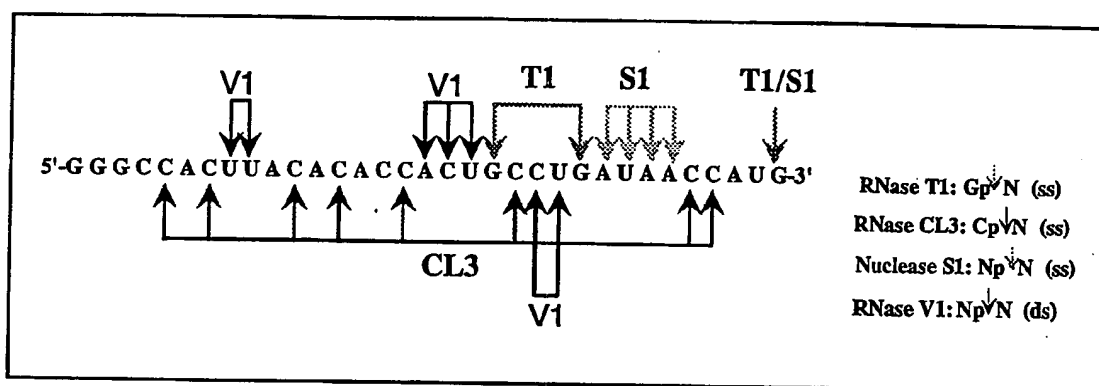
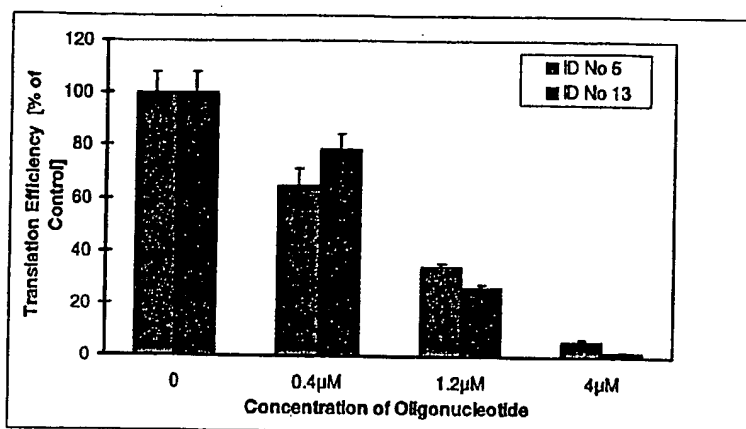
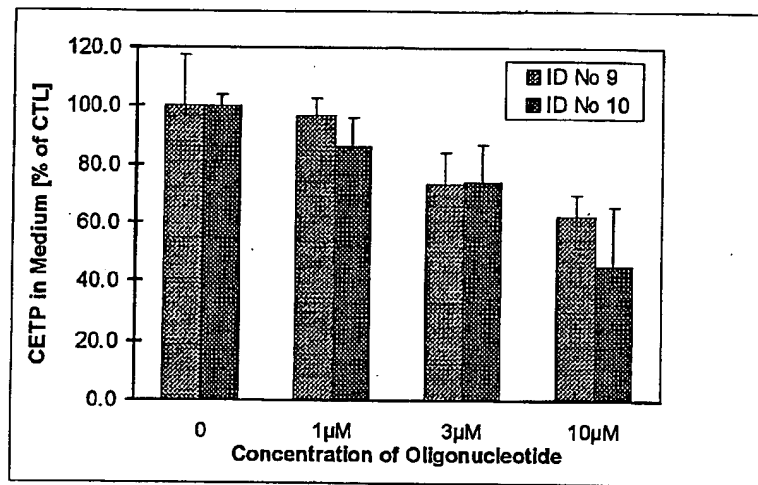


Fig. 3



**Fig. 4**



*Fig. 5*

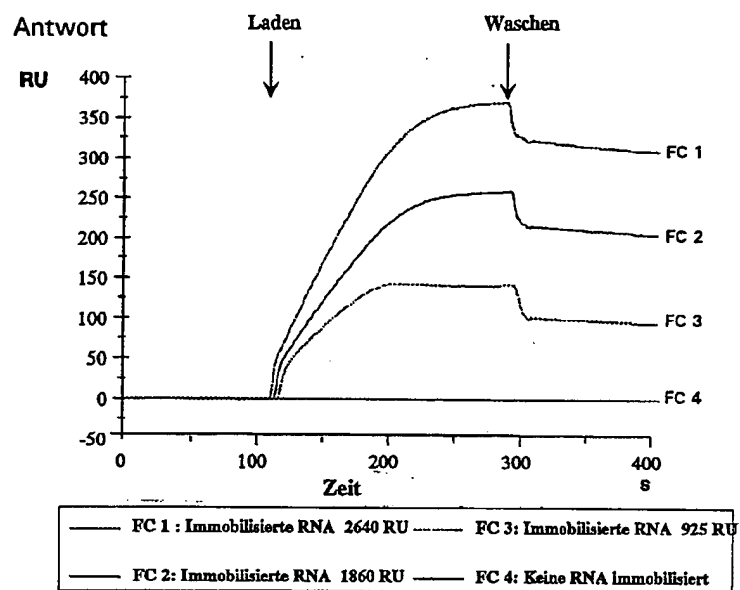


Fig. 6